

=> D 3 ALL

06 MAY 1998 10:02:32

U.S. Patent & Trademark Office

P0075

06-99

Jan. 11, 1994

L19: 3 of 6

DETECTION OF NUCLEIC ACID

INVENTOR: AKIO MATSUHISA, et al. (3)

ASSIGNEE: FUSO YAKUHHIN KOGYO KK, et al. (80)

APPL NO: 04-159349

DATE FILED: Jun. 18, 1992

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

ABS GRP NO: C1187

ABS VOL NO: Vol. 18, No. 198

ABS PUB DATE: Apr. 7, 1994

INT-CL: C12Q 1/68; G01N 33/50; G01N 33/58; //G01N 27/447

ABSTRACT:

PURPOSE: To provide a method for detecting nucleic acid which is easy, safe, reliable and simple.

06 MAY 1998 10:02:33

U.S. Patent & Trademark Office

P0076

06-99

Jan. 11, 1994

L19: 3 of 6

DETECTION OF NUCLEIC ACID

CONSTITUTION: A solid carrier suspected to attach or contain nucleic acid is brought into contact with a polyamine to which a label (or its precursor) capable of giving measurable signals is bound, forming a composite made up of the nucleic acid and the polyamine. In case the precursor is used, it is transformed into the label. Before and after the transformation, the residual polyamine not forming the above composite is eliminated and then the label is probed, thus detecting the nucleic acid.

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-99

(43)公開日 平成6年(1994)1月11日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	A	7823-4B		
G 0 1 N 33/50	P	7055-2J		
33/58	A	7055-2J		
// G 0 1 N 27/447		7235-2J	G 0 1 N 27/ 26	3 2 5 Z
			審査請求	未請求 請求項の数3(全 8 頁)

(21)出願番号 特願平4-159349

(22)出願日 平成4年(1992)6月18日

(71)出願人 000238201

扶桑薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号

(72)発明者 松久 明生

奈良県奈良市右京2-1-2-32-504

(72)発明者 芝 清隆

東京都豊島区池袋本町4-28-5-301

(72)発明者 三河 義一

アメリカ合衆国カリフォルニア州サンディ

エゴ、シャルマン・ドライブ7425番2808

(72)発明者 岸 雄一郎

和歌山県和歌山市吹屋町5-53-4

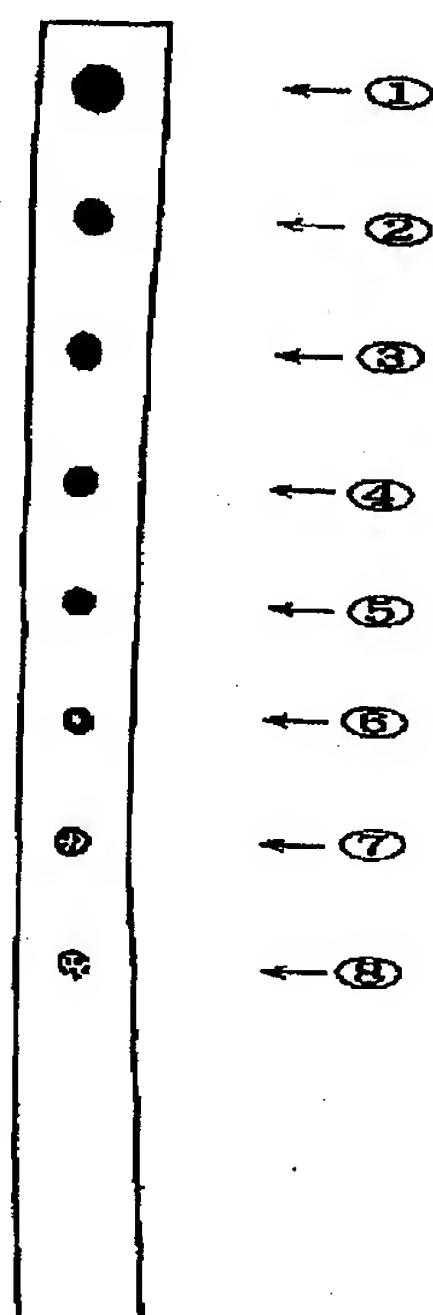
(74)代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

(54)【発明の名称】 核酸の検出法

(57)【要約】

【目的】 容易、安全、確実、簡便な核酸検出法を提供すること。

【構成】 核酸を付着または含有している疑のある固形担体に、測定可能なシグナルを発生し得る標識またはその前駆体を結合させたポリアミンを接触させて、核酸とポリアミンとの間で複合体を形成させ、前駆体を用いた場合は標識に変換し、その前または後に複合体を形成していないポリアミンを除去し、その後、標識を検索することを特徴とする、核酸の検出法。



1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 核酸を付着または含有している疑のある固形担体に、測定可能なシグナルを発生し得る標識またはその前駆体を結合させたポリアミンを接触させて、核酸とポリアミンとの間で複合体を形成させ、前駆体を用いた場合は標識に変換し、その前または後に複合体を形成していないポリアミンを除去し、その後、標識を検索することを特徴とする、核酸の検出法。

【請求項2】 標的核酸を付着または含有している疑のある固形担体に、(イ)測定可能なシグナルを発生し得る標識またはその前駆体を結合させた標的核酸にハイブリダイズし得るプローブをハイブリダイゼーション条件下で接触させて、ハイブリッドを形成させ、前駆体を用いた場合は標識に変換し、その前または後にハイブリッドを形成していないプローブを除去し、その後、標識を検索することを含む第1の検出操作、および(ロ)測定可能なシグナルを発生し得る別の標識またはその前駆体を結合させたポリアミンを接触させて、核酸とポリアミンとの間で複合体を形成させ、前駆体を用いた場合は標識に変換し、その前または後に複合体を形成していないポリアミンを除去し、その後、標識を検索することを含む第2の検出操作、を組合わせて任意の順序で実施することを特徴とする、標的核酸とそれ以外の核酸の識別検出法。

【請求項3】 (イ)酵素で標識したポリアミン、および(ロ)酵素作用によりシグナルを発生する色原体を含む、核酸検出用キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、ポリアミンが核酸と静電的に結合する性質を利用した核酸の検出法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】核酸の検出法としては、従来、臭化エチジウムを用いる方法が広く行なわれている。この方法は、核酸に臭化エチジウムを複合(インターカレーション)させ、その際発せられる蛍光によって核酸の位置を知る方法である。しかし、この方法によるときは明所では蛍光を確認できないため、暗所で紫外線照射下に撮影した像を現物と対照して核酸の位置を知らねばならず、不便であった。また、臭化エチジウムは強い発がん性を有するので[例えば「遺伝子操作マニュアル」(講談社サイエンティフィック)第2頁第18-21行]、取扱いが危険であった。そのほかの方法として、アニオン性金コロイドを用いる方法およびカチオン性カコジル酸鉄コロイドを用いる方法[ジーン・アナリシス・テクニクス(Gene Anal. Techn.)1986年、1-5頁]が知られている。しかし、これらはどれも感度が悪く、また金コロイドによる方法は背景染色であるから識別が容易でなく、さらに染

2

色後のハイブリダイゼーションが影響を受けるという欠点があり、鉄コロイドによる方法はハイブリダイゼーション後の染色ができないという欠点があった。したがって、上記のような欠点のない、容易、安全、確実、簡便な核酸検出法の開発が望まれていた。

【0003】ポリアミンがDNAに結合し、またRNAにも親和性を有することは既に知られている[バイオケミカル・ジャーナル(Biochem.J.)103巻、811-815頁(1967)、ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J.Mol.Biol.)24巻、113-122頁(1967)、ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J.Mol.Biol.)42巻、363-373頁(1969)、ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J.Mol.Biol.)121巻、327-337頁(1978)等]。また、ポリアミンで修飾した蛋白質相補的ポリヌクレオチドと共有結合させてなるプローブを、標的ポリヌクレオチドの検出に用いることも公知である(特表昭60-501488号、その公告公報である特公平2-59720号およびその分割出願である特開平1-124400号)。しかし、標識したポリアミンを核酸に複合させることによる核酸検出法は知られていない。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】この発明は、(1)核酸を付着または含有している疑のある固形担体に、測定可能なシグナルを発生し得る標識またはその前駆体を結合させたポリアミンを接触させて、核酸とポリアミンとの間で複合体を形成させ、前駆体を用いた場合は標識に変換し、その前または後に複合体を形成していないポリアミンを除去し、その後、標識を検索することを特徴とする、核酸の検出法、(2)標的核酸を付着または含有している疑のある固形担体に、(イ)測定可能なシグナルを発生し得る標識またはその前駆体を結合させた標的核酸にハイブリダイズし得るプローブをハイブリダイゼーション条件下で接触させて、ハイブリッドを形成させ、前駆体を用いた場合は標識に変換し、その前または後にハイブリッドを形成していないプローブを除去し、その後、標識を検索することを含む第1の検出操作、および(ロ)測定可能なシグナルを発生し得る別の標識またはその前駆体を結合させたポリアミンを接触させて、核酸とポリアミンとの間で複合体を形成させ、前駆体を用いた場合は標識に変換し、その前または後に複合体を形成していないポリアミンを除去し、その後、標識を検索することを含む第2の検出操作、を組合わせて任意の順序で実施することを特徴とする、標的核酸とそれ以外の核酸の識別検出法および(3)(イ)酵素で標識したポリアミン、および(ロ)酵素作用によりシグナルを発生する色原体を含む、核酸検出用キットを提供するものである。

【0005】この発明で使用する用語について説明すると次の通りである。「核酸」は、プリンまたはピリミジン塩基、ペントースおよびリッ酸が結合してなるヌクレオチドを基本単位とし、リッ酸のエステル結合によって



3

重合したポリマーである。塩基としては、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、ウラシルおよびそれらの修飾塩基が含まれる。また、核酸には糖部分の違いによってDNAとRNAがあり、さらに1本鎖、2本鎖等および立体構造の違いがある。「固形担体」は、核酸の分離または検出に用いられる薄板、シート、ストリップ、スラブ、フィルム、メンブラン等を包含する。代表的なものは、アガロースゲル、ナイロン膜、濾紙、ニトロセルロース膜等である。

【0006】「標識」は、測定可能なシグナルを発生する物質であり、酵素(基質との組合わせとして)、スピ化合物、放射性核種、蛍光物質、化学発光物質、吸光物質等が含まれる。好ましい標識は酵素である。酵素としては、ペルオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素等が含まれる。酵素活性の測定法には、吸光度法、蛍光法および化学発光法がある。例えば、ペルオキシダーゼは色原体としては2,2'-アジノジ(3-エチルベンズチアゾリン)-6'-スルホン酸(ABTS)のような基質を用い、生じた色素を吸光度法で測定する。グルコースオキシダーゼはグルコースを基質として過酸化水素を生ずるので、ペルオキシダーゼと共役させて上と同様に測定できる。 $\beta$ -ガラクトシダーゼはo-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトシドを基質として測定できる。蛍光法としては、例えばペルオキシダーゼはp-ヒドロキシフェニルプロピオン酸を基質として、 $\beta$ -ガラクトシダーゼはフルオレスセイン- $\beta$ -D-ガラクトシドまたは4-メチルウンベリフェリル- $\beta$ -D-ガラクトシドを基質として、またホスファターゼはウンベリフェリルりん酸またはプロモクロロインドリルホスフェート/ニトロブルーテトラゾリウムを基質として測定できる。化学発光法としては、例えばペルオキシダーゼはルミノールと過酸化水素を基質として測定できる。標識(例えば酵素)をポリアミンに結合させるには、例えばベンゾキノ(キンヒドロ)、ビス[2-(スクシンイミドカルボニルオキシ)エチル]スルホン(BSOCOES)、ビス(スルホスクシンイミジル)スベラート(BS3)、1,2-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン(DFDNB)、4,4'-ジイソチオシアノ-2,2'-ジスルホスチルベン、ジナトリウム塩(CDIDS)、アジピンイミドジメチル・ジ塩酸塩、N-( $\alpha$ -マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミド(GMBS)、N-(4-アジドフェニルチオ)フタルイミド(ATP)、N-スクシンイミジル-6-(4'-アジドフェニル)-1,3'-ジチオプロピオナート(SADP)、ピリジンジスルフィド、チオフタルイミド等の架橋試薬を用いる。「標識前駆体」は、例えば阻害物質でブロックされた標識のように、標識に転換され得る物質である。

4

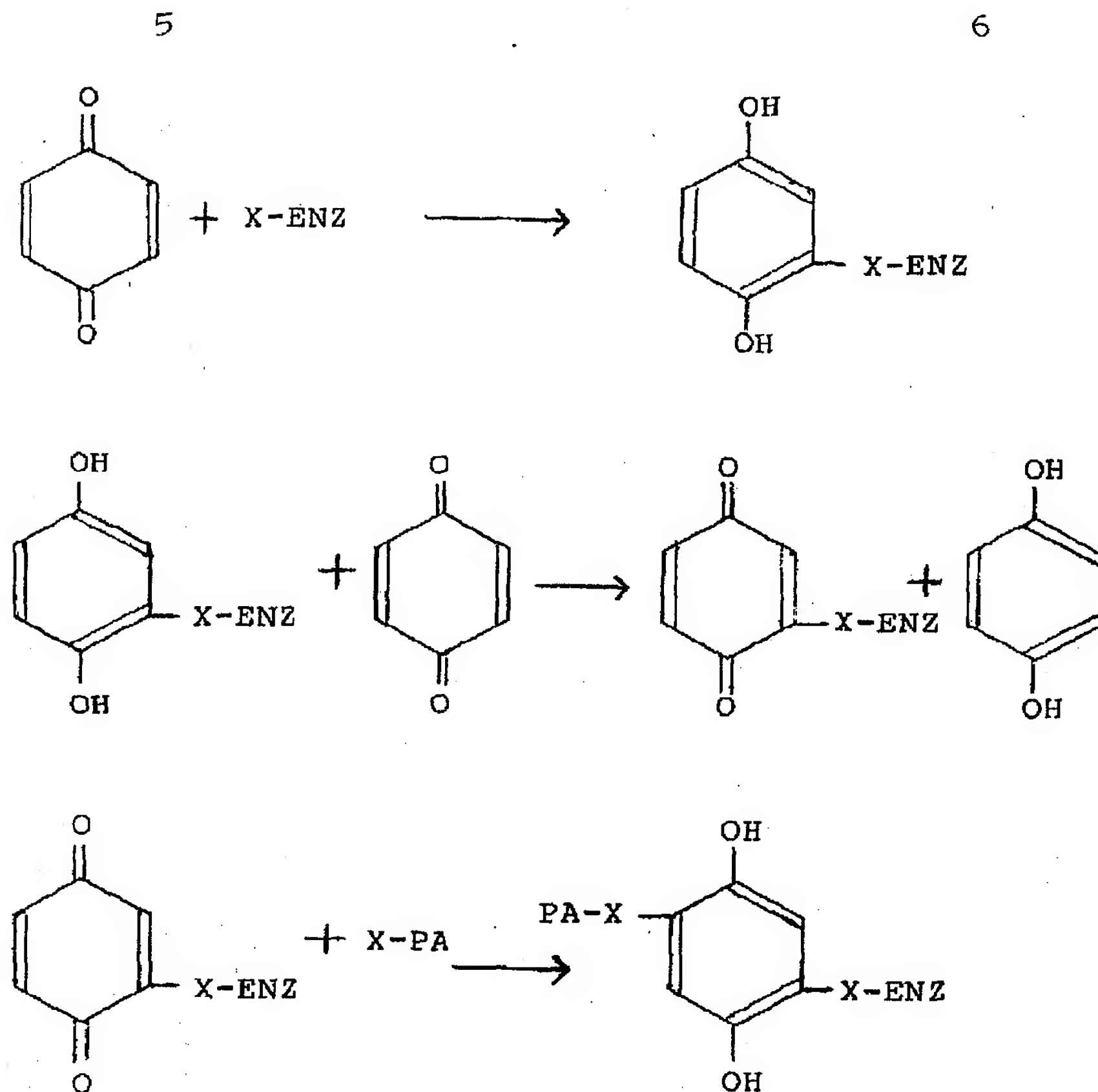
「シグナル」は、可視光、蛍光、放射能、その他の電磁波等である。測定値をそれを発生した物質の量と関連づけることができるものが好ましい。「標識の探索」は、上記のようなシグナルを肉体的または機械的手段で検出することを含む。

【0007】「ポリアミン」は、第1級アミノ基を2個以上有する脂肪族骨格の化合物であり、天然(生体)アミンおよび合成ポリマーが含まれる。通常炭素原子数3~50、好ましくは6~15または20程度の脂肪族鎖の両端に第1級アミノ基があり、鎖がイミノ基で中断されることがあり得る。代表的な天然ポリアミンは、1,3-ジアミノプロパン、プトレッツシン、カダベリン、ノルスペルミジン、スペルミジン、ホモスペルミジン、アミノプロピルカダベリン、テルミン、スペルミン、テルモスペルミン、カナバルミン、アミノペンチルノルスペルミジン、N,N'-ビス(アミノプロピル)カダベリン、カルドペンタミン、ホモカルドペンタミン、カルドヘキサミン等である。代表的な合成ポリアミンには、ジエチレントリアミン、トリエチレンテトラミン、テトラエチレンペンタミン、ペンタエチレンヘキサミン、ヘキサメチレンジアミン、ポリエチレンイミン(平均分子量約10,000~約200,000、好ましくは約20,000~約100,000、例えば約50,000~約60,000のもの、例えばBASF社のポリミンG35)等が含まれる。

【0008】「複合」または「複合体」は、静電的および/または物理的結合または結合物を意味し、共有結合または結合物を意味しない。通常、複合は可逆的であり、容易に解離させることができる。「ハイブリダイズ」または「ハイブリダイゼーション」とは、2本の1本鎖ポリヌクレオチドが相補的またはほぼ(例えば70%以上、好ましくは80または85%以上、特に90または95%以上)相補的である場合に、結合して2本鎖を形成することをいう。「ハイブリダイゼーション条件下」とは、ハイブリダイズし得るポリヌクレオチドがハイブリッドを形成する条件をいう。一般に、この条件は、温度として約70℃以下、好ましくは約60℃以下、通常、約40~55℃を含む。時間は短時間で充分である。「標的」は、関心の対象であることを表わす。「プローブ」は、標的DNAまたはその一部分と相補性が高いDNAであり、通常、標的DNAより短く、約5~50塩基、好ましくは約10~40塩基、例えば約20~30塩基からなる。

【0009】代表的な実施方法を概説すると次の通りである。ベンゾキノを用いる酵素とポリアミンの結合を例にとると、反応は、下記反応式に従って進行すると考えられている。

【化1】



〔上式中、ENZは酵素からアミノ基を除いた残基、P Aはポリアミンからアミノ基を除いた残基、Xは第1級または第2級アミノ基である〕

【0010】この反応は、例えば次のように行なわれる。透析のような手段で精製した酵素(約150部)にベンゾキノン(約1部)を加え、好ましくは僅かに加温して反応させるとワイン赤色の反応液となる。これをゲル濾過等の方法でクロマトグラフィー的に分離すると紫色、黄色およびワイン赤色のフラクションに分かれる。ワイン赤色のフラクションをとり、弱塩基の存在下にポリアミン(酵素の数分の1量)を僅かな加温下に反応させ、適宜精製すると酵素標識したポリアミンが得られる。

【0011】核酸の検出は、例えば次のようにして行うことができる。

(イ)核酸試料をメンブランにドットスポットするか、またはアガロースゲル電気泳動後メンブランにエレクトロトランスファーし、ベーキングして固定する。緩衝液に入れたうし血清アルブミンで処理後、標識または前駆体を結合したポリアミンを加えて反応させる。洗浄後、標識前駆体の場合は標識に変換し、検索する。

(ロ)DNAフラグメントをアガロースゲル電気泳動に付し、サザンブロッティングする。放射能標識したプローブを用いて、加温下にプレハイブリダイゼーション後、ハイブリダイゼーションを行なう。洗浄後、X線フィル\*

\*ムでDNAの位置を調べる。その後、標識または前駆体を結合したポリアミンを反応させ、適宜発色させて検索する。

30 (ハ)DNAフラグメントをドットブロッティングによるかまたはアガロースゲル電気泳動後のサザンブロッティングによりメンブランに固定し、プレハイブリダイゼーション後Bio-DNAプローブを用いてハイブリダイゼーションを行なう。洗浄、ブロック後、酵素標識したストレプトアビジンに反応させ、洗浄、プレインキュベーション後さらに別の酵素で標識したポリアミンを反応させる。洗浄後、それぞれの酵素の発色処理に付すると、2色の発色により、ハイブリダイズしたDNAとハイブリダイズしないDNAが異なる色に発色した像が得られる。例えば、アルカリホスファターゼ/BCIP-NBT系は紫、ペルオキシダーゼ/DAB系は褐色に発色する。この方法において、プローブとポリアミンの処理順序は逆にすることもできる。

40 【0012】上記のようにして発色処理したものは、X線フィルムとしてではなくメンブランそのものが発色しているので、直接メンブラン上に核酸を確認することができる。また、PCRの場合、同程度の分子量をもつが配列が異なる増幅物を、ハイブリダイゼーションにより区別することができる。この発明の方法は、危険な試薬を用いる必要がなく、高感度(例えば、DNAは数ピコ

7

グラム、RNAは数十ピコグラム)であり、しかも、操作が容易であるという利点を有する。なお、この発明の実施に必要な試薬類をキットにしておくと、操作がさらに容易となる。

#### 【0013】

【実施例】以下、実施例によりこの発明の具体的実施態様を説明する。

#### 実施例1

(ペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ標識ポリエチレンイミンの製造)アルカリホスファターゼ(CIP、ベーリンガー・マイハイム社、グレードI)0.81ml/4.05mg/7500単位または西洋わさびペルオキシダーゼ(ベーリンガー・マンハイム社製)を、40℃で一夜、0.1Mりん酸緩衝液で透析し、イムノケミストリー(Immuno Chemistry)14巻767-774頁(1977年)記載の方法にしたがって、p-ベンゾキノ(120μl/30mg/エタノール)と遮光下37℃で60分間反応させ、セファデックスG-25でゲル濾過後、ワイン赤色のフラクション(2.7ml)を分取した。これに300μlの1M-NaHCO<sub>3</sub>(pH9.0)、30μlのポリエチレンイミン(エポミン)を加え、よく混合した。これを37℃で遮光下に一夜反応させた後、5mMりん酸緩衝液(pH6.8)で透析して酵素・ポリエチレンイミン・コンジュゲートを得た。本品は4℃で1年以上安定であった。

【0014】(メンブラン上の核酸のプロットイング)「モレキュラー・クローニング」(“Molecular Cloning”, 1982年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー)記載の方法に従って、ナイロンメンブラン(ポール社製Biodyne A)上に変性したλHind III DNAまたはエシエリキア・コリ(E. coli)K-12 rRNAをドットプロットイングした。また、ベクターpBR322のHind III 部位にランダムクローニングしたスタフィロコッカス・アウレウス(St. aureus)ゲノムDNAのクローンを、定法により増幅、抽出した後、Hind IIIで処理した。試料を1%アガロースゲル電気泳動で分離後、メンブラン上にエレクトロプロットイングした。(40V, 4時間)。同様に、λHind III DNAもプロットイングした。これらのDNAまたはRNA試料はベーキング(80℃、2時間)することにより、メンブラン上に固定した。

【0015】(メンブラン上にプロットした核酸の検出)固定されたDNAまたはRNAを含むメンブランを5mMりん酸緩衝液-1%うし血清アルブミン(BSA、シグマ社、フラクションV)に浸し、室温で60分間インキュベートした。次に、アルカリホスファターゼ(またはペルオキシダーゼ)標識ポリエチレンイミンを100μl/20mlの割合で加え、37℃で120分間インキュベートした。メンブランを5mMりん酸緩衝液-1%BSA-0.1%ツイーン20で10分間づつ3回洗浄

8

し、0.1MトリスHCl(pH9.5)-10mM-MgCl<sub>2</sub>でリンスした。ブロモクロロインドリルホスフェート(BCIP)75mg/ml 0.1MトリスHCl(pH9.5)-10mM-MgCl<sub>2</sub> 20mlおよびニトロブルーテトラゾリウム(NBT)50mg/ml各300μl/50mlを加えた発色液中でメンブランを発色させた。

【0016】(サザン・ブロット・ハイブリダイゼーション)スタフィロコッカス・アウレウス(St. aureus)ゲノムkbpフラグメントDNAを使用し、常法に従って<sup>32</sup>P-dCTPまたはBio-11-dUTP(BRL)を用いてニックトランスレーション反応を実施し、<sup>32</sup>P-DNAまたはBio-DNAを調製した。変性したプローブを含むハイブリダイゼーション緩衝液(5×SSC、0.1%BSA、0.1%ツイーン20)により、メンブランを42-55℃で一夜ハイブリダイゼーション処理した。その後、55℃で30分間、0.16×SSC-0.1%ツイーン20で洗浄した(時点A)。<sup>32</sup>P-DNAプローブを用いた場合は、時点Aでメンブランを湿ったままサランラップに包み、X線フィルムに露出してシグナルを検出した。その後、メンブランを42℃で3時間以上にわたり3%BSA-0.1%ツイーン20-りん酸緩衝食塩水(PBS)でブロッキング処理し、ペルオキシダーゼ標識ポリエチレンイミンを100μl/シート(30)の割合で0.1%BSA-0.1%ツイーン-PBSに加え、2-3時間反応させた。ついで、0.1%ツイーン20-PBSで20分間づつ3回洗浄し、ジアミノベンジデイン(DAB)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>系で発色させた。Bio-DNAプローブを用いた場合は、時点A後、PBS-0.5%ツイーン20を用いて室温で60分間処理した。ついで、アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジンを含むPBS-0.05%ツイーン20により室温で20分間処理後、PBS-0.5%ツイーン20で10分間づつ2回洗浄した。次に、PBS-1%BSA-0.1%BSA-0.1%ツイーン20を用いて室温で20分間ブレインキューベーション後ペルオキシダーゼ標識ポリエチレンイミンを加え、42℃で3時間反応させた。メンブランをPBS-0.1%ツイーン20で10分間づつ3回洗浄後、0.1MトリスHCl(pH9.5)-10mM-MgCl<sub>2</sub>でリンスし、BCIP-NBT系を用いて室温で20分間発色処理した。PBSで10分間づつ3回洗浄後、さらにDAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>系で発色処理した。メンブランをPBS-0.1%ツイーン20で洗浄後保存した。

#### 【0017】(結果)

(イ) λDNAまたはエシエリキア・コリ(E. coli)rRNAをドットスポットし、アルカリホスファターゼ標識ポリエチレンイミンで検出した結果をそれぞれ図1および図2に示す。スポット量は、図1の上からλDNA①4.7μg、②470ng、③47ng、④4.7ng、⑤470pg、⑥47pg、⑦4.7pg、⑧470fg、図2の上か



ら $\gamma$ RNA①5 $\mu$ g、②500ng、③50ng、④5ng、⑤500pg、⑥50pgである。DNAでは470fg、RNAでは50pgの感度で検出できた。

(ロ)  $\lambda$ Hind III DNAの希釈系列を作り、その各試料をアガロースゲル電気泳動で分り後、ゲルからメンブランへエレクトロブロッティングしたものを、アルカリホスファターゼ標識ポリエチレンイミンで検出した結果を図3に示す。ここでは、希釈系列(0.06 $\mu$ g)の試料においても、ゲル分り後のエチジウムブロミド染色パターンと、ブロッティングの検出パターンは完全に一致していた。これによりこの発明の方法の正しさが裏づけられた。

(ハ)  $\lambda$ Hind III DNAのサイズマーカーを含むpBR322に挿入されたDNA断片を、制限酵素で切り出した後、アガロースゲル電気泳動で分りし、メンブラン上にエレクトロブロッティングし、 $^{32}$ P-DNAプローブでハイブリダイズして、そのハイブリッドをX線フィルムに露出して、シグナル(図5)を得た。このハイブリダイズしたDNAの種類を特定するために、そのメンブランをペルオキシダーゼ標識ポリエチレンイミン処理し、すべてのブロッティングされたDNAの位置(図4)を確認した。

(ニ) 上記(ハ)と同様に行なったものを、Bio-DNAプローブを用いた系でハイブリダイズすることにより、ハイブリダイズしたDNAとハイブリダイズしなかったDNAを同時に検出した。ここでは、Bio-プローブとアルカリホスファターゼストレプトアビジン、ペルオキ

シダーゼ標識ポリエチレンイミンのそれぞれ酵素を使い分けることにより、ハイブリダイズしたDNAと非ハイブリダイズDNAを2重染色することにより区別することができた。結果を図7に示す。また、色の違いを図8に示す。図中、斜線部は褐色(ペルオキシダーゼ標識ポリエチレンイミン系)、黒色部は紫色(アルカリホスファターゼ/ストレプトアビジン系)を示す。そのパターンは、同様に行なってエチジウムブロミド染色した結果(図6)と一致していた。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1における $\lambda$ DNAの検出結果を示す図である。

【図2】実施例1におけるエシエリキア・コリ(E. coli)rRNAの検出結果を示す図である。

【図3】実施例1における $\lambda$ Hind III DNAの電気泳動の写真である。

【図4】実施例1において、pBR322に挿入されたDNA断片を制限酵素で消化したもの(本発明による発色)の電気泳動の写真である。

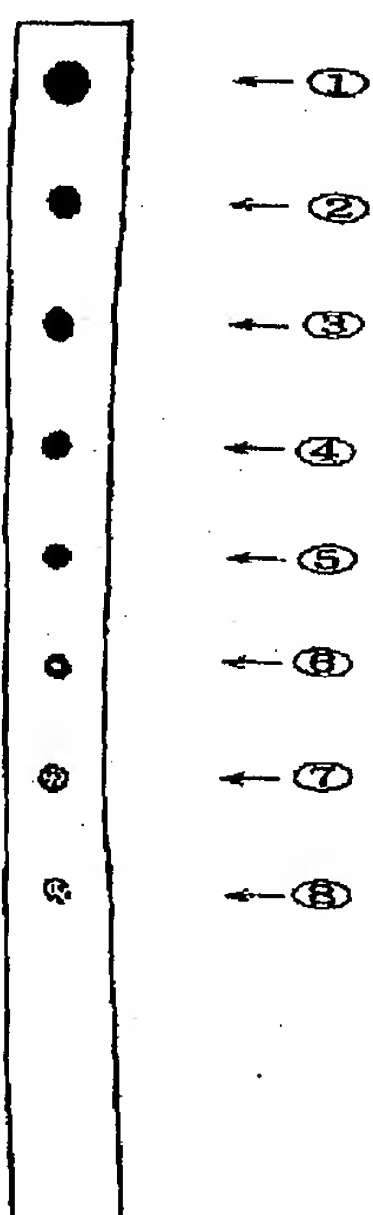
【図5】実施例1において、pBR322に挿入されたDNA断片を制限酵素で消化したもの(X線像)の電気泳動の写真である。

【図6】実施例1における $\lambda$ Hind III DNAの電気泳動の写真である。

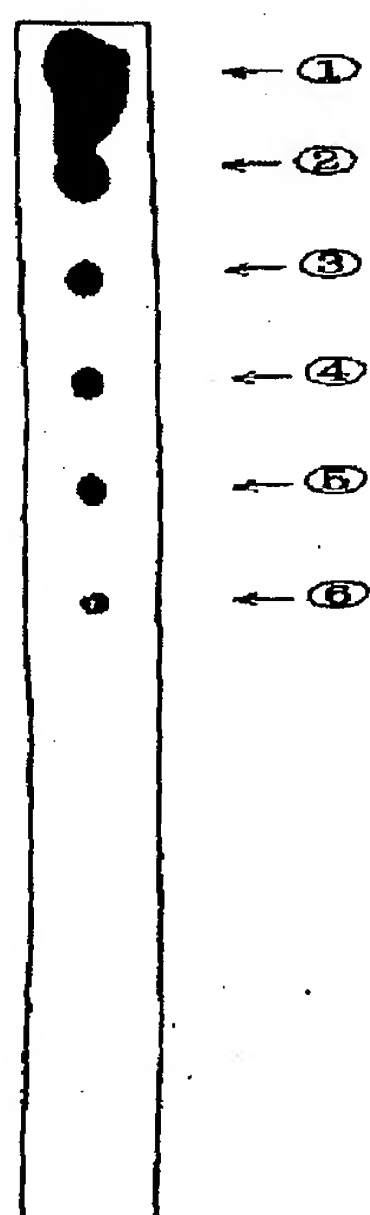
【図7】実施例1における図6と同じ $\lambda$ Hind III DNAの電気泳動の写真である。

【図8】図7における色の違いを示す図である。

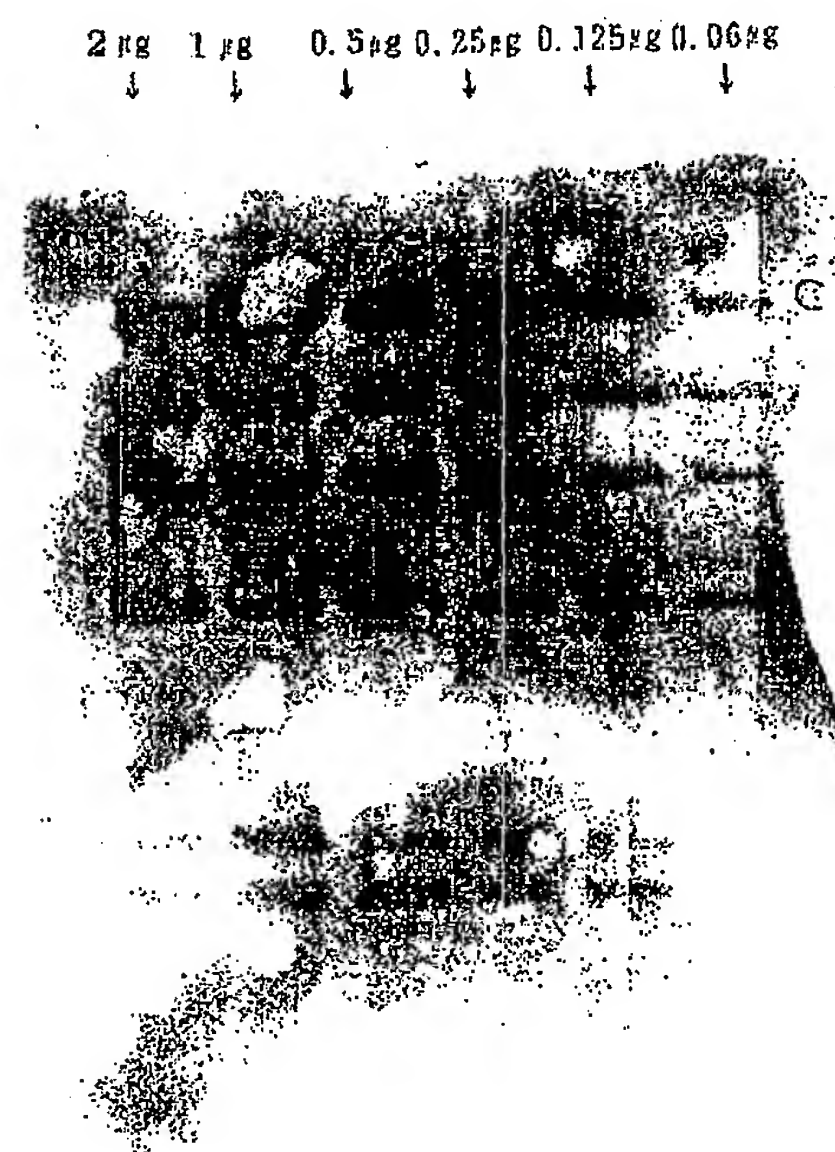
【図1】



【図2】

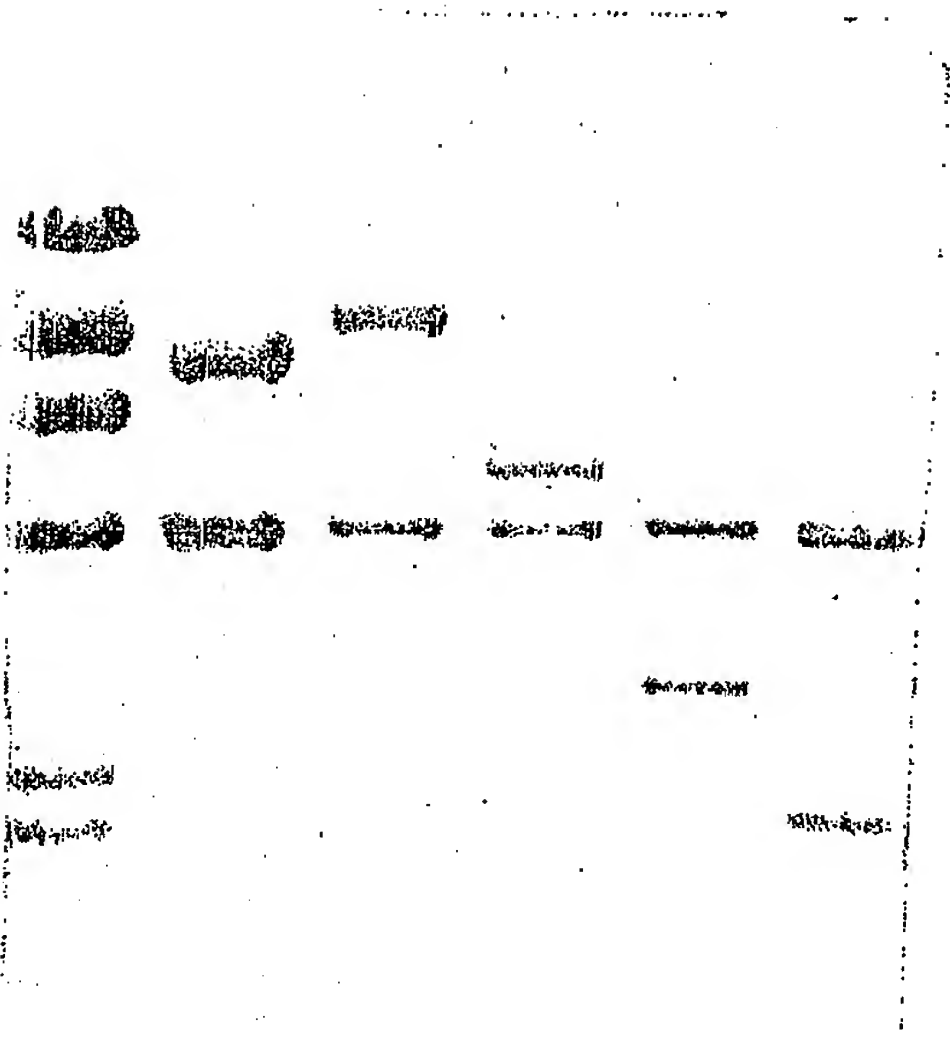


【図3】



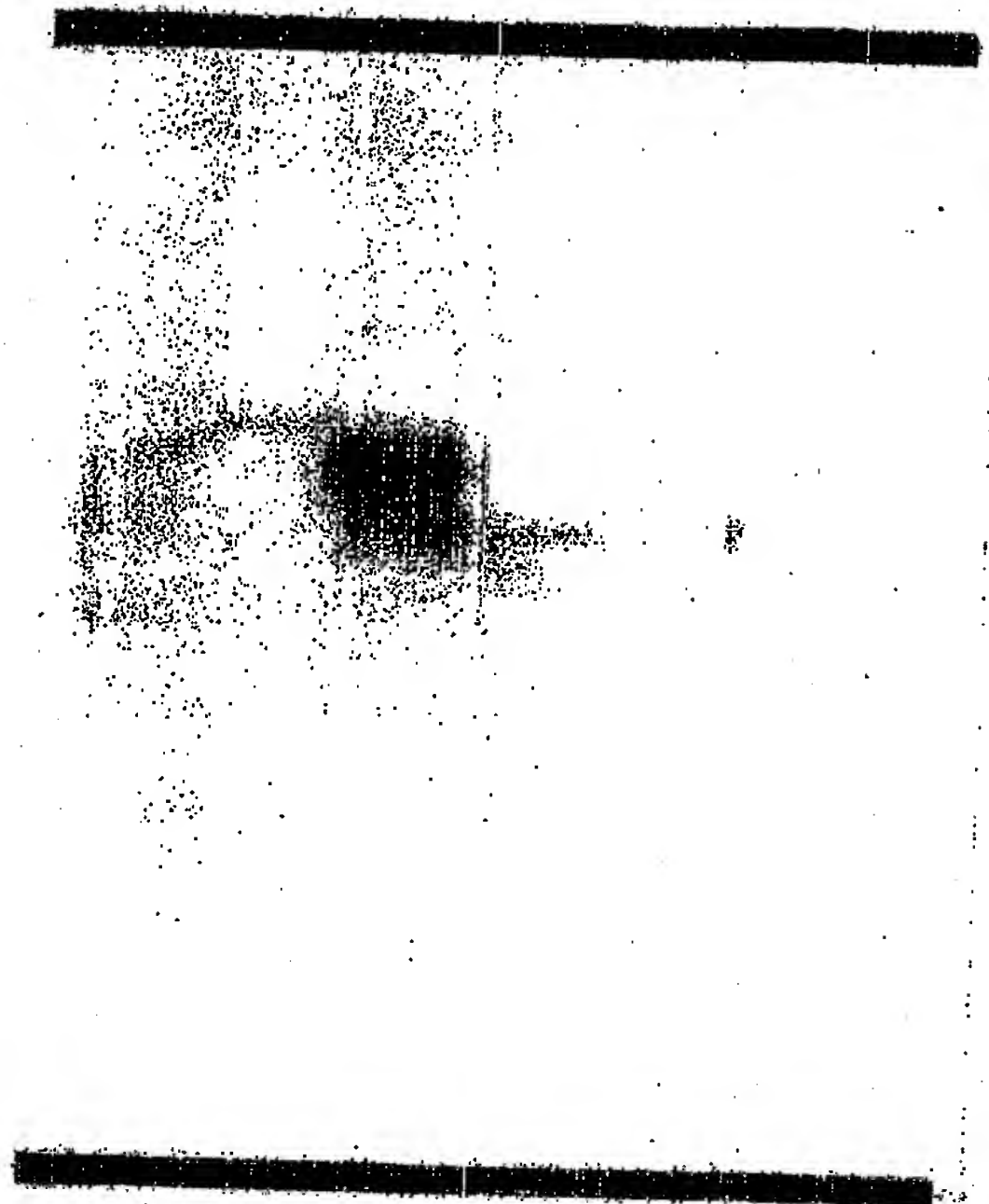
【図4】

λ Hind III マーカー  
↓



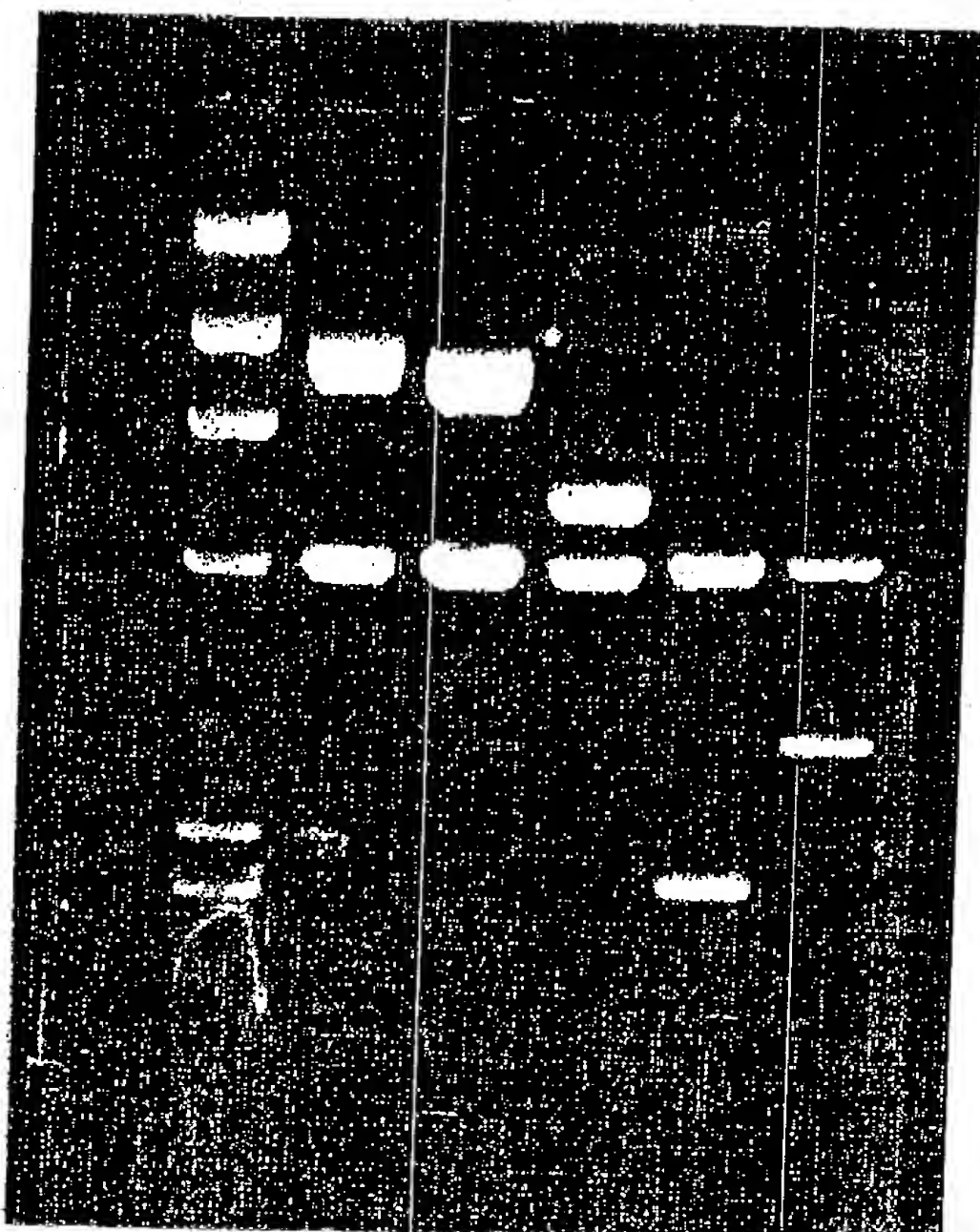
←  
PBR  
322

【図5】



【図6】

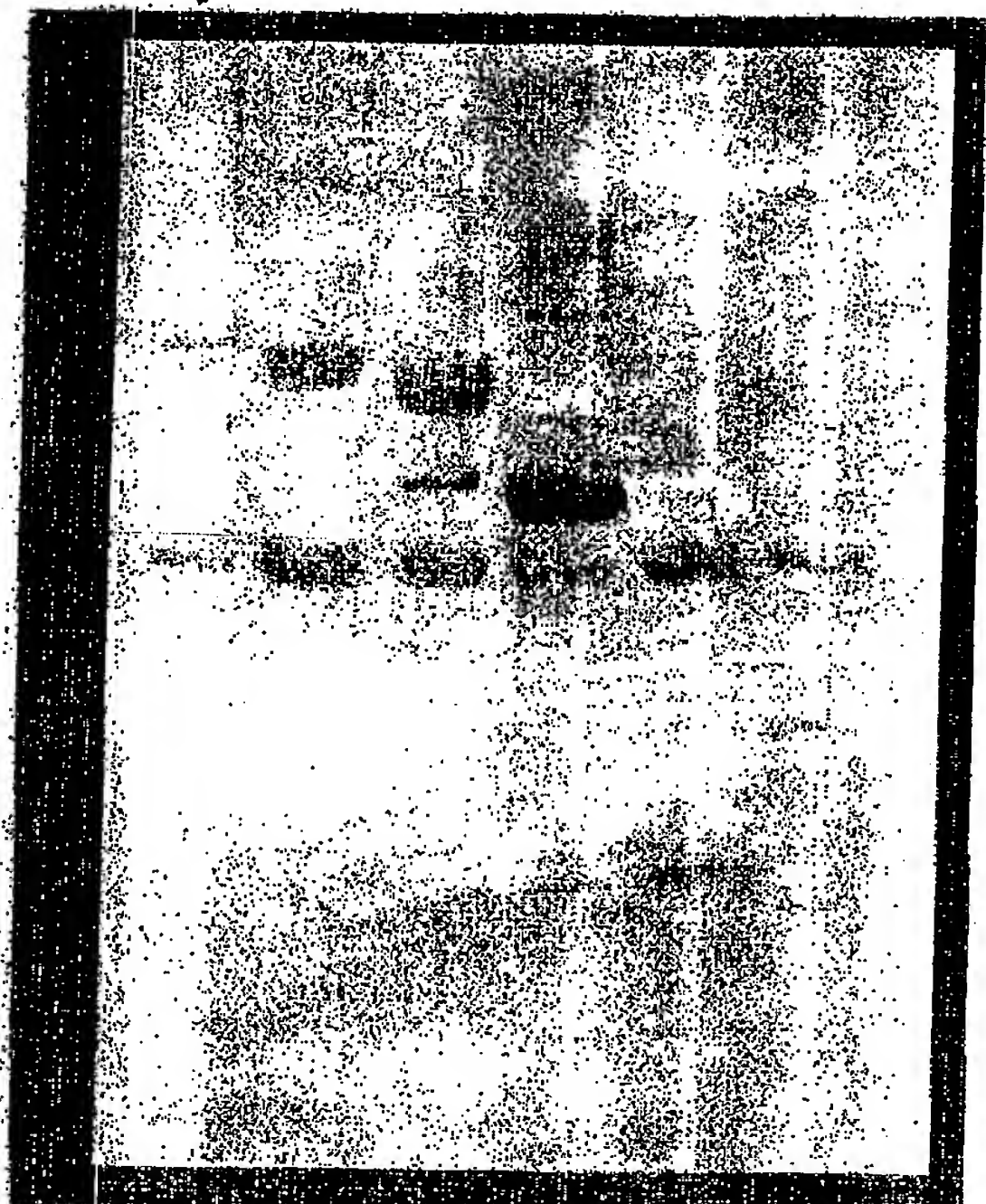
λ Hind III マーカー  
↓



←  
PBR  
322

【図7】

λ Hind III マーカー  
↓





【図8】

